Extraction of high purity fucoidans from brown seaweeds using cellulases and alginate lyases

International Journal of Biological Macromolecules 229 (2023) 199–209

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Extraction of high purity fucoidans from brown seaweeds using cellulases and alginate lyases

Nanna Rhein-Knudsen, Diego Reyes-Weiss, Svein Jarle Horn *

Faculty of Chemistry, Biotechnology, and Food Science, Norwegian University of Life Sciences (NMBU), P.O. Box 5003, 1432 Ås, Norway

- **Introduction**
- **Objective**
- **Methodology**
- **Results and discussion**
- **Conclusion**

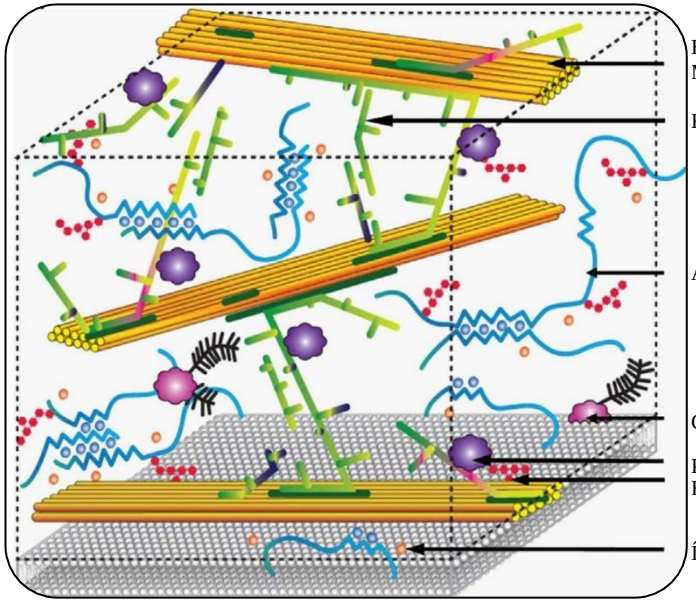
Brown algae

They are uni- or multicellular photosynthetic organisms, which can grow in fresh and/or salt water environments.

Class: Phaeophyceae

- *Saccharina latíssima*

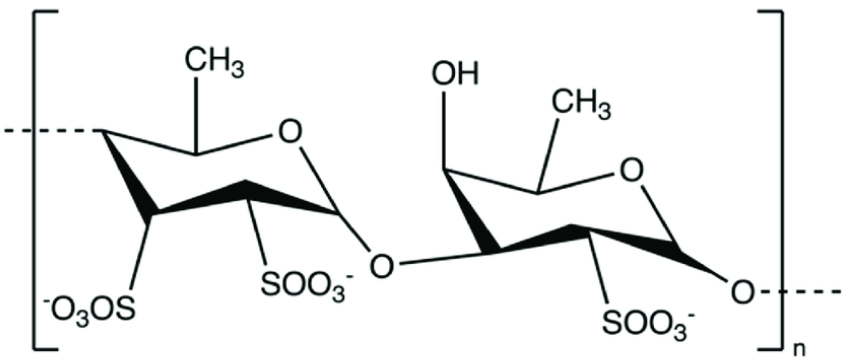
- *Alaria esculenta*



Fonte: Penalver et al., 2020.

Fucoidan

Fucoidan consists mainly of fucose with α−(1,3) and α−(1,4) glycosidic linkages and recent α−(1,2) linkages and the presence of sulfate groups. In addition to fucose, it also contains other monosaccharides, including galactose, glucose, mannose, xylose, rhamnose and uronic acids.



Fucoidan

Extraction methods

- Acidic
- Alkaline
- Enzymatic → cellulase and alginate lyases

Purification methods

- Chromatographic
- Ultrafiltration

Fonte: Mazeas et al., 2023; Dobrinei et al., 2020.

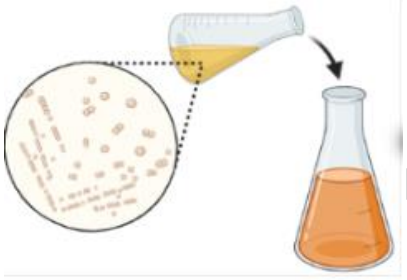
- Introduction
- **Objective**
- Methodology
- Results and discussion
- Conclusion

General objective

Extract fucoidans from brown algae (*Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*) using a commercial combination of cellulase and different proportions of thermophilic alginate lyases with endo (AMOR-PL7) and exo (AMOR-PL17) action.

- Introduction
- Objective
- **Methodology**
- **Results and discussion**
- Conclusion

Production of alginate lyases

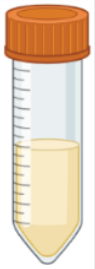


Escherichia coli

Cells were harvested by centrifugation at 4000 g, 20 min, 4 ◦ C and frozen to promote cell lysis.

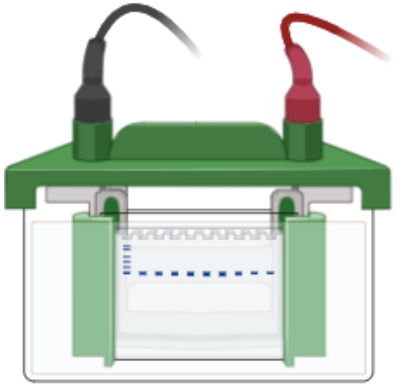
Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM

Cell debris were removed by centrifugation at 12000 rpm for 20 min

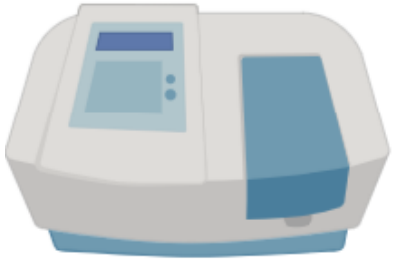


cell-free extract was filtered before purification by immobilized metal affinity chromatography

Elution was done with a linear gradient of 20–500 mM Imidazole in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl.



AMOR-PL7 and AMOR-PL17, respectively, were pooled together before imidazole was removed and the buffer was exchanged to 25 mM NaOAc, pH 5.6, 200 mM NaCl using a HiPrep™ 26/10 desalting column



Protein: 280 nm absorbance

Chemical and enzymatic extraction of fucoidan

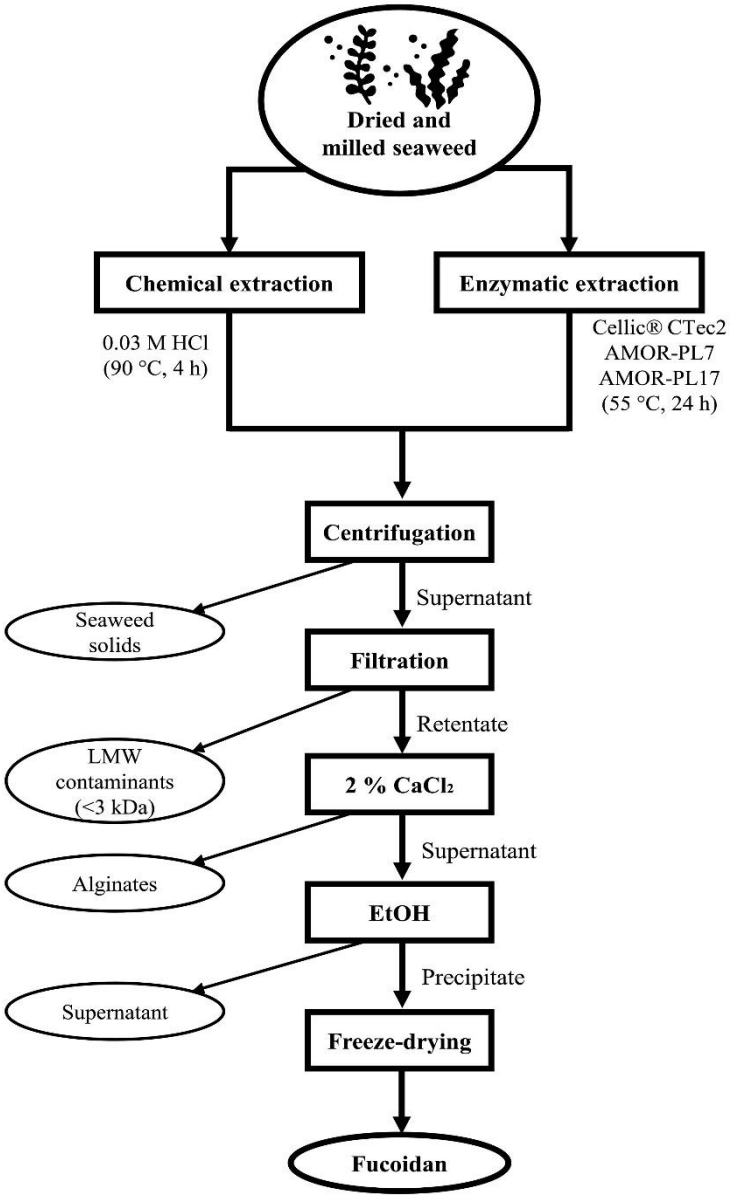


Fig. 1. Schematic outline of the chemical and enzymatic fucoidan extraction procedures

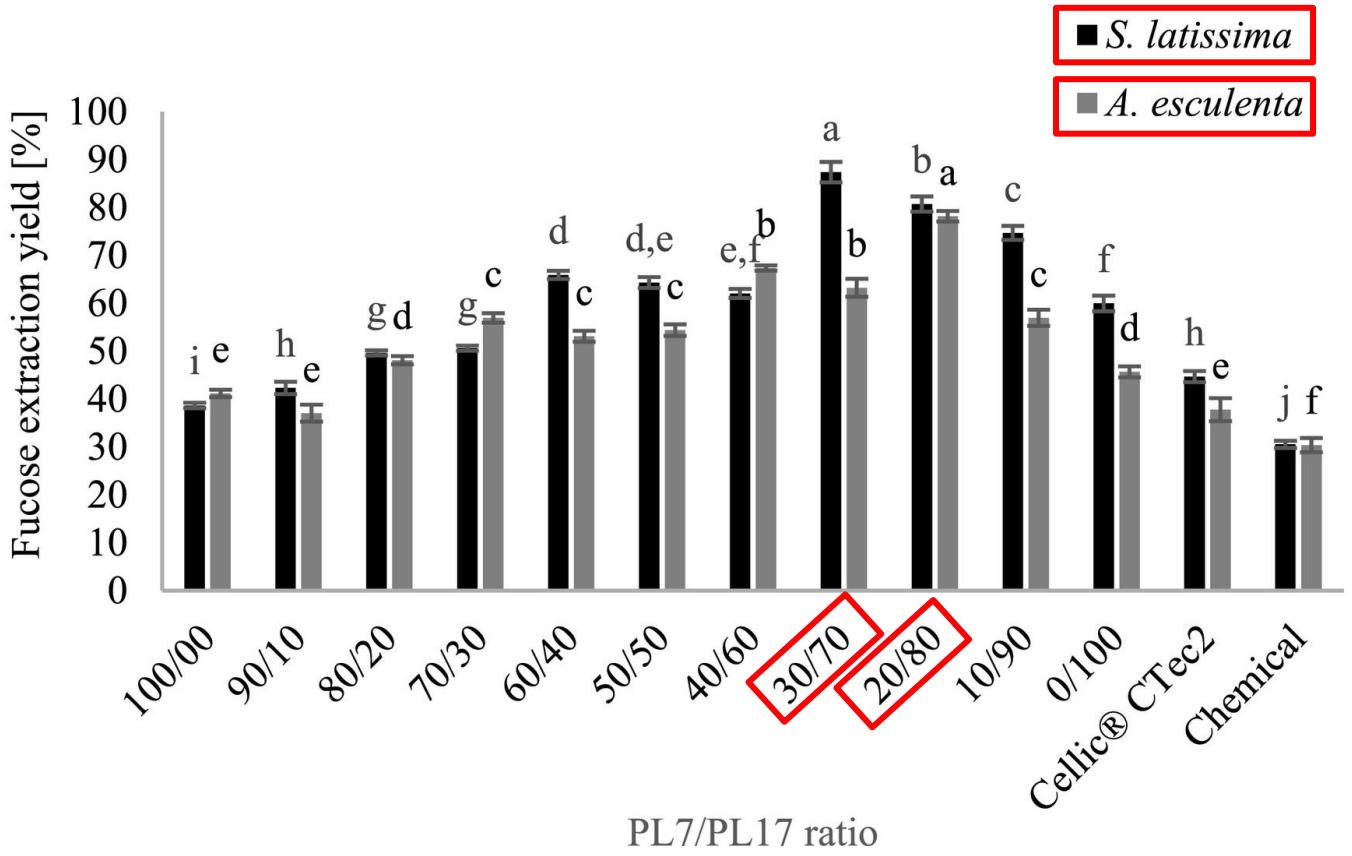
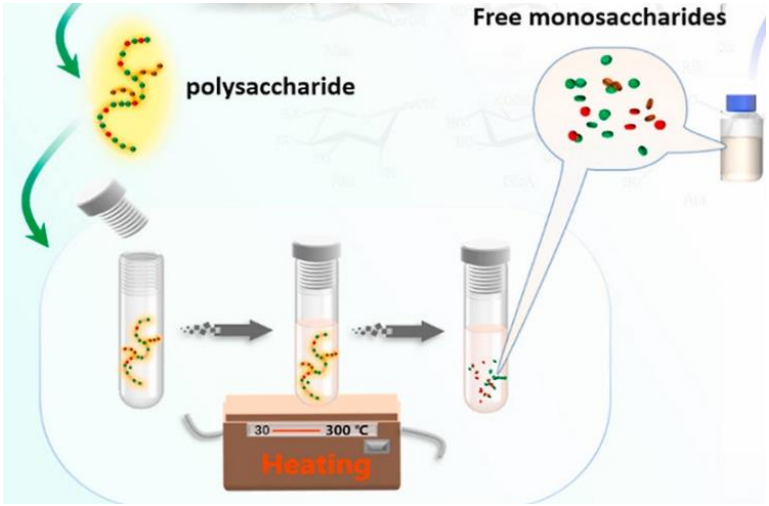


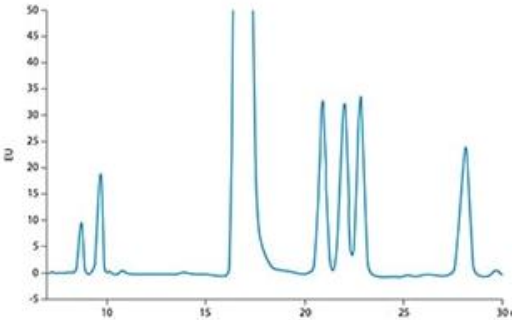
Fig. 2. Rendimentos de extração de fucoidan (fucose) para as duas biomassas S. latissima (■) e A. esculenta (■) para os diferentes procedimentos de extração expressos em porcentagem (p/p). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) para S. latissima e A. esculenta por ANOVA unidirecional.

Analysis of monosaccharide composition and sulfate content

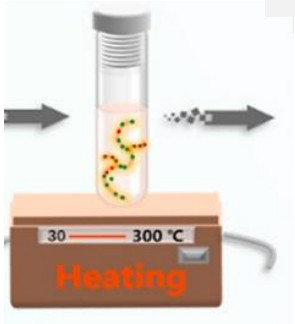
Hidrólise dos fucoidans: TFA 2 M a 100 2 C por 6 h.



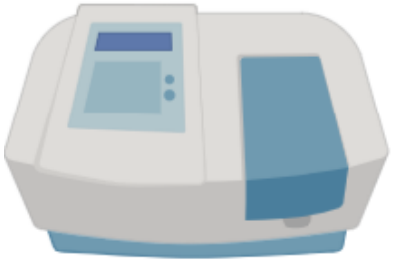
Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) usando um sistema ICS5000+ (Dionex)



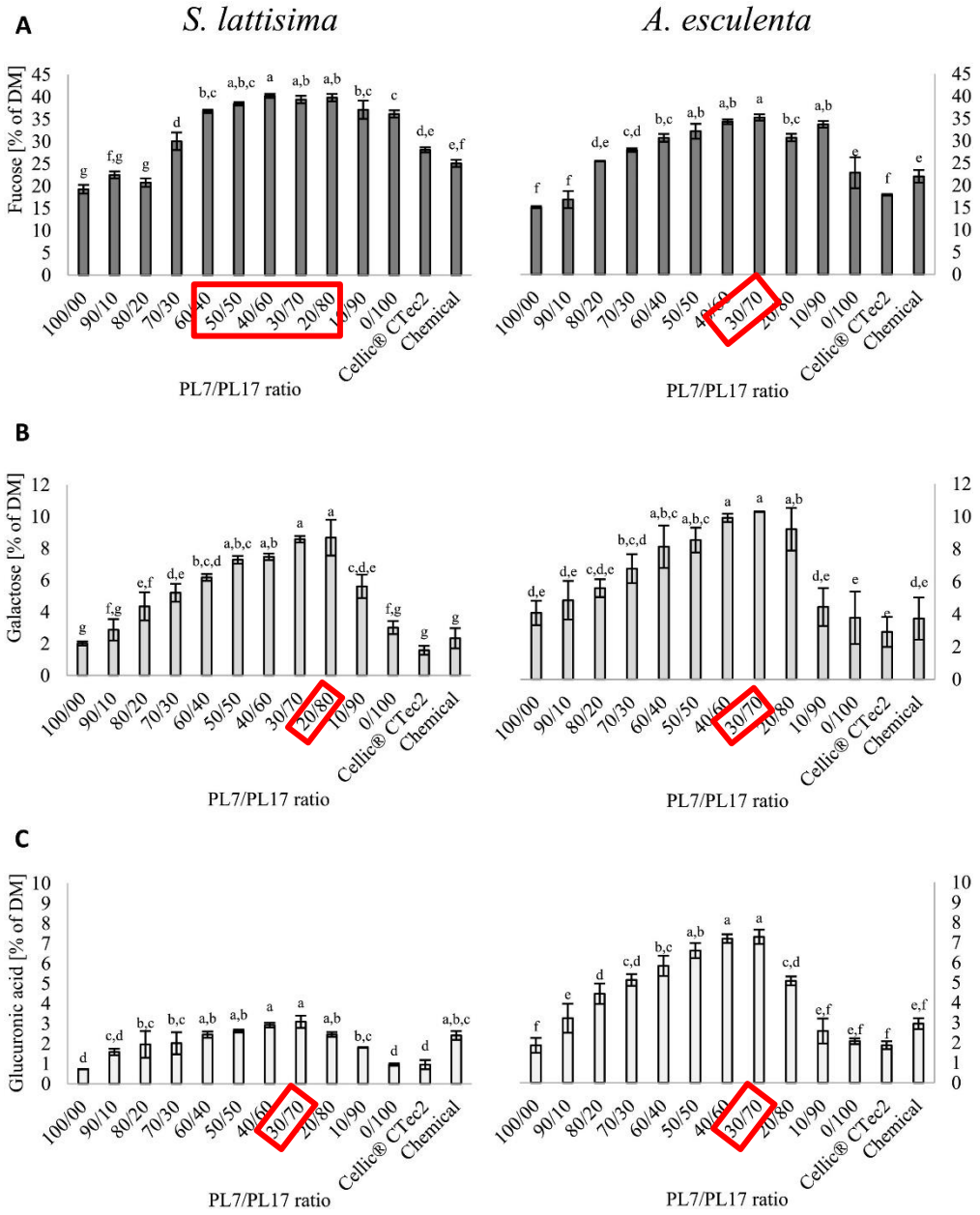
Sulfate content



110 uL de amostra foram misturados com 120 uL de ácido tricloroacético a 8%
As reações foram misturadas e incubadas por aprox. 35 min antes do $BaSO_4$.



A curva padrão medida em 500 nm.



Essas combinações de enzimas produziram um teor de fucose 60% superior ao desenvolvido pela técnica de concentração química, que consiste em 25% e 22% de fucose para S. latissima e A. esculenta, respectivamente..

Fig. 3. Teor de monômeros nos fucoidans, expresso em porcentagem (p/p) de MS, de S. latissima (lado esquerdo) e A. esculenta (lado direito) de A) fucose, B) galactose, C) ácido glucurônico para os diferentes procedimentos de extração. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) para S. latissima e A. esculenta por ANOVA oneway.

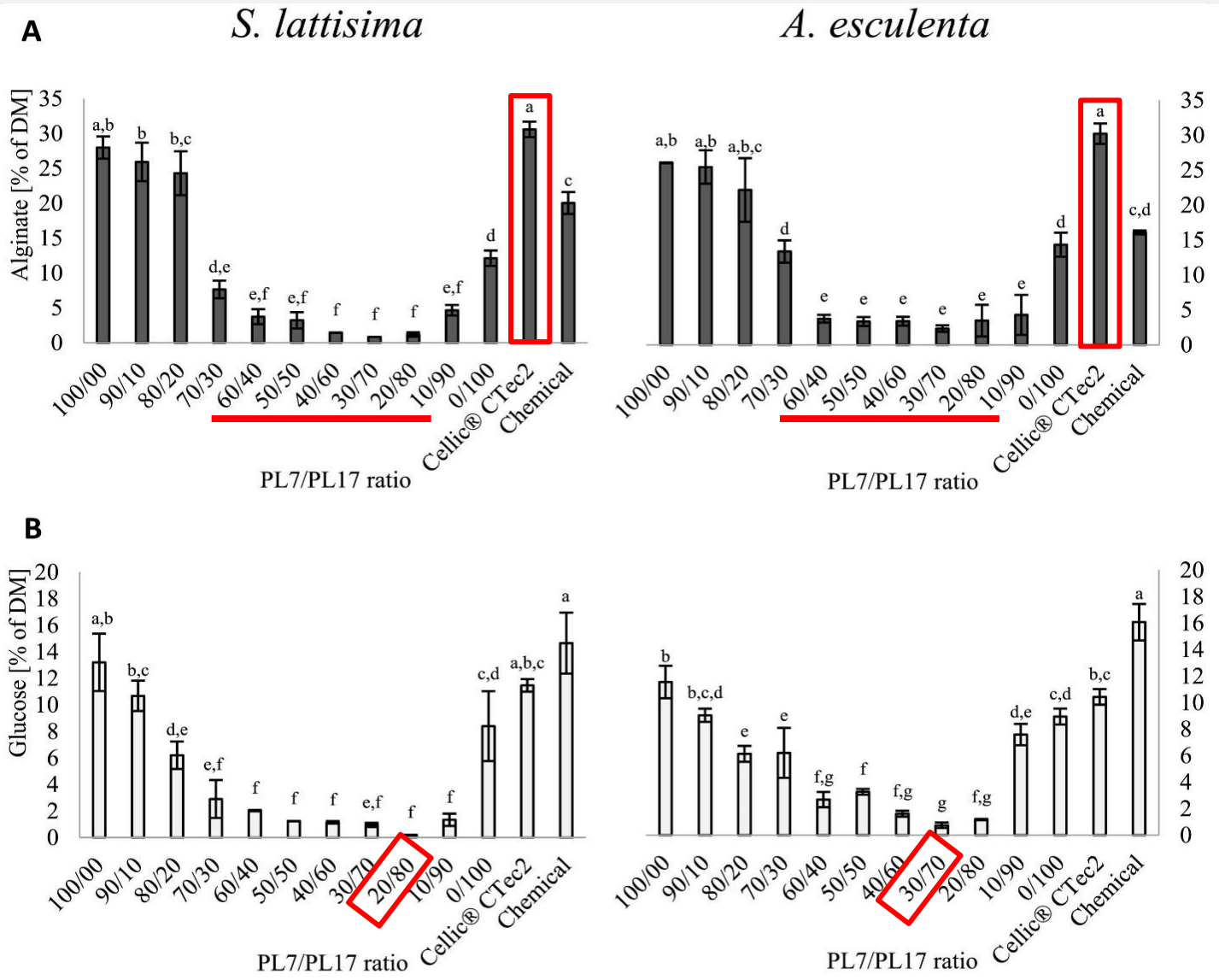


Fig. 4. Teor de impurezas nos fucoidans, expresso em porcentagem (m/m) de MS, de S. latissima (lado esquerdo) e A. esculenta (lado direito). A) teor de alginato (soma dos ácidos manurônico e gulurônico) e B) teor de glicose para os diferentes procedimentos de extração. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) para S. latissima e A. esculenta por ANOVA unidirecional.

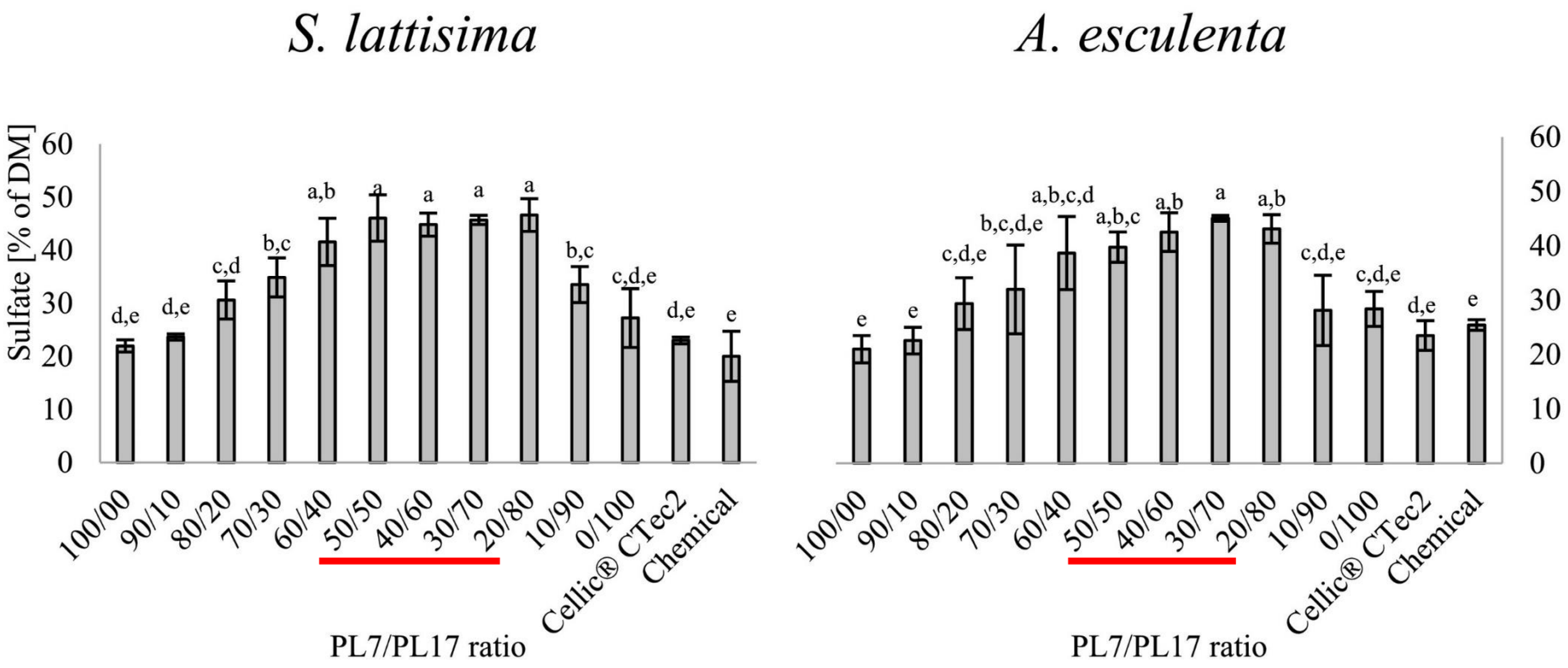


Fig. 5. Teor de sulfato nos fucoidans, expresso em porcentagem (m/m) de MS de S. latissima (lado esquerdo) e A. esculenta (lado direito) para os diferentes procedimentos de extração. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) para S. latissima e A. esculenta por ANOVA unidirecional.

Table 1. Grau de sulfatação (razão molar de SO42−:fucose) e razão molar de galactose: fucose: SO42− (Gal:Fuc: SO42−) de fucoidans extraídos de S. latissima e A. esculenta pelas diferentes combinações de extração.

PL7/PL17 ratio	*S. latissima*		*A. esculenta*	
	Degree of sulfation	Molar ratio Gal:Fuc: SO_4^{2-}	Degree of sulfation	Molar ratio Gal:Fuc: SO_4^{2-}
100/00	$1.7 \pm 0.0^{a,b}$	1:11:20	2.1 ± 0.2^{a}	1:5:10
90/10	$1.6 \pm 0.1^{b,c}$	1:10:15	$2.1 \pm 0.4^{a,b}$	1:4:9
80/20	2.2 ± 0.3^{a}	1:6:13	$1.8 \pm 0.3^{a,b}$	1:6:10
70/30	$1.8 \pm 0.3^{a,b}$	1:7:13	$1.7 \pm 0.5^{a,b}$	1:5:9
60/40	1.7 ± 0.2^{b}	1:7:13	$1.9 \pm 0.4^{a,b}$	1:5:9
50/50	$1.8 \pm 0.2^{a,b}$	1:7:12	$1.9 \pm 0.2^{a,b}$	1:5:9
40/60	1.7 ± 0.1^{b}	1:7:11	$1.9 \pm 0.2^{a,b}$	1:4:8
30/70	$1.8 \pm 0.0^{a,b}$	1:6:10	$1.9 \pm 0.0^{a,b}$	1:4:8
20/80	$1.8 \pm 0.1^{a,b}$	1:6:10	2.1 ± 0.1^{a}	1:4:9
10/90	$1.4 \pm 0.2^{b,c,d}$	1:8:11	1.3 ± 0.3^{b}	1:9:12
0/100	$1.1 \pm 0.2^{c,d}$	1:15:17	$1.9 \pm 0.2^{a,b}$	1:7:14
Cellic® CTec2	1.1 ± 0.0^{d}	1:22:24	$2.0 \pm 0.3^{a,b}$	1:8:15
Chemical	$1.4 \pm 0.1^{b,c,d}$	1:13:18	1.8 ± 0.2^{a}	1:8:14

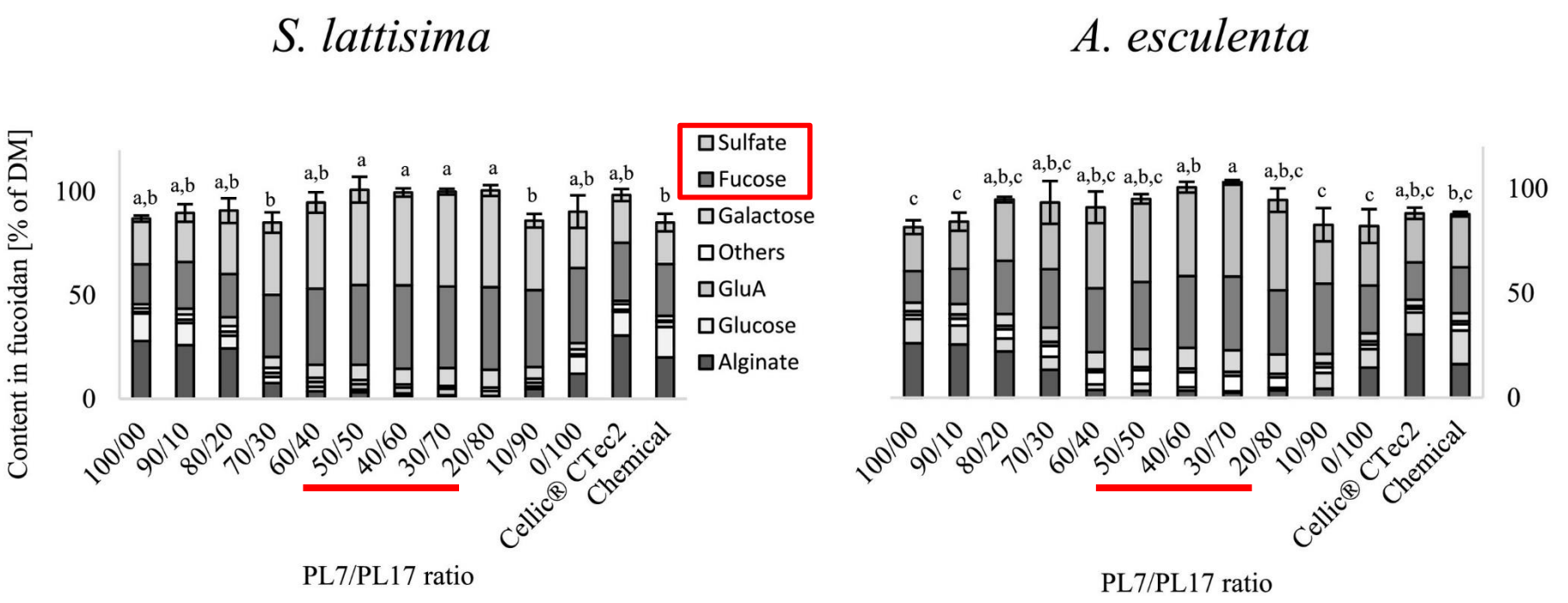
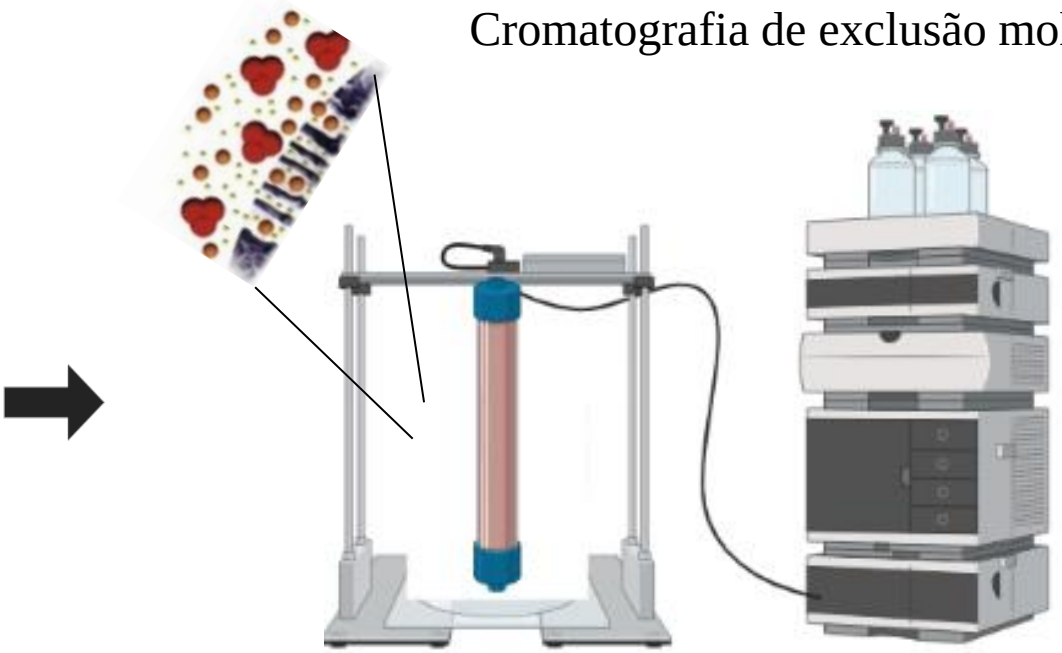


Fig. 6 Balanço de massa dos diferentes fucoidans extraídos de S. latissima (lado direito) e A. esculenta (lado esquerdo) para os diferentes procedimentos de extração. Outros incluem manitol, xilose e manose. Letras diferentes indicam diferenças significativas (P <0,05) para S. latissima e A. esculenta por ANOVA unidirecional.

Determination of molecular weight by size exclusion chromatography

Samples
(5-10 mg/mL)



Cromatografia de exclusão molecular

Elution: 0.15 M NaNO3, 0.01 M EDTA,
Flux: 0.5 mL/min.
Standard: Pullulan (1.3 to 800 kDa).

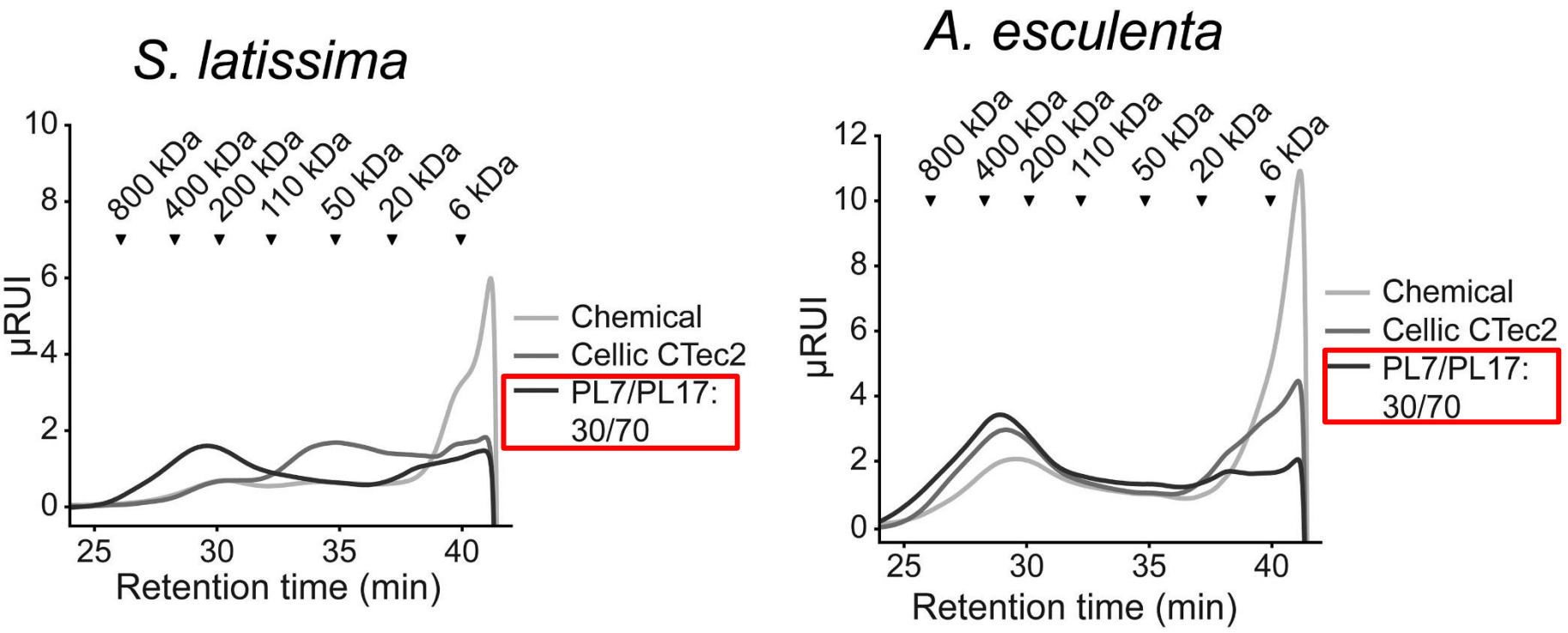


Fig. 7. Cromatograma de exclusão de tamanho (SEC-RI) de fucoidanos extraídos usando o método de extração química (cinza claro), Cellic® CTec2 sozinho (cinza escuro) e Cellic® CTec2 combinado com alginato liases PL7/PL17 em uma proporção de 30/70 (preto). Os padrões Pullulan são indicados por triângulos pretos.

Os fucoidanos extraídos enzimaticamente apresentam os pesos moleculares mais elevados quando se comparam diferentes técnicas de extração, indicando que os polímeros de fucoidanos não estão sendo degradados durante a extração, em comparação com os fucoidanos extraídos quimicamente, que possuem maiores quantidades de moléculas de baixo peso molecular.

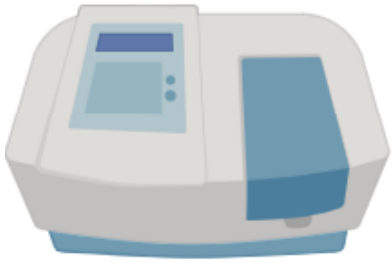
Optimization of reaction conditions

Extracion Fucoidan

Para determinação da cinética de extração, a liberação de glicose durante a extração de fucoidan foi monitorada de 0 a 20 h usando as condições ideais de extração de fucoidan identificadas (Cellic® CTec2 combinado com PL7/PL17 em uma proporção de 30/70).

Centrifugação

50 µL de amostra foram misturados com 100 µL de solução DNS e fervidos por 15 min. Resfriado e a absorbância a 540 nm foi lida usando um espectrofotômetro UV. Extremidades redutoras.



A formação de ligações duplas pelas reações de eliminação da alginato liase foi monitorada monitorando a absorvância a 235 nm.

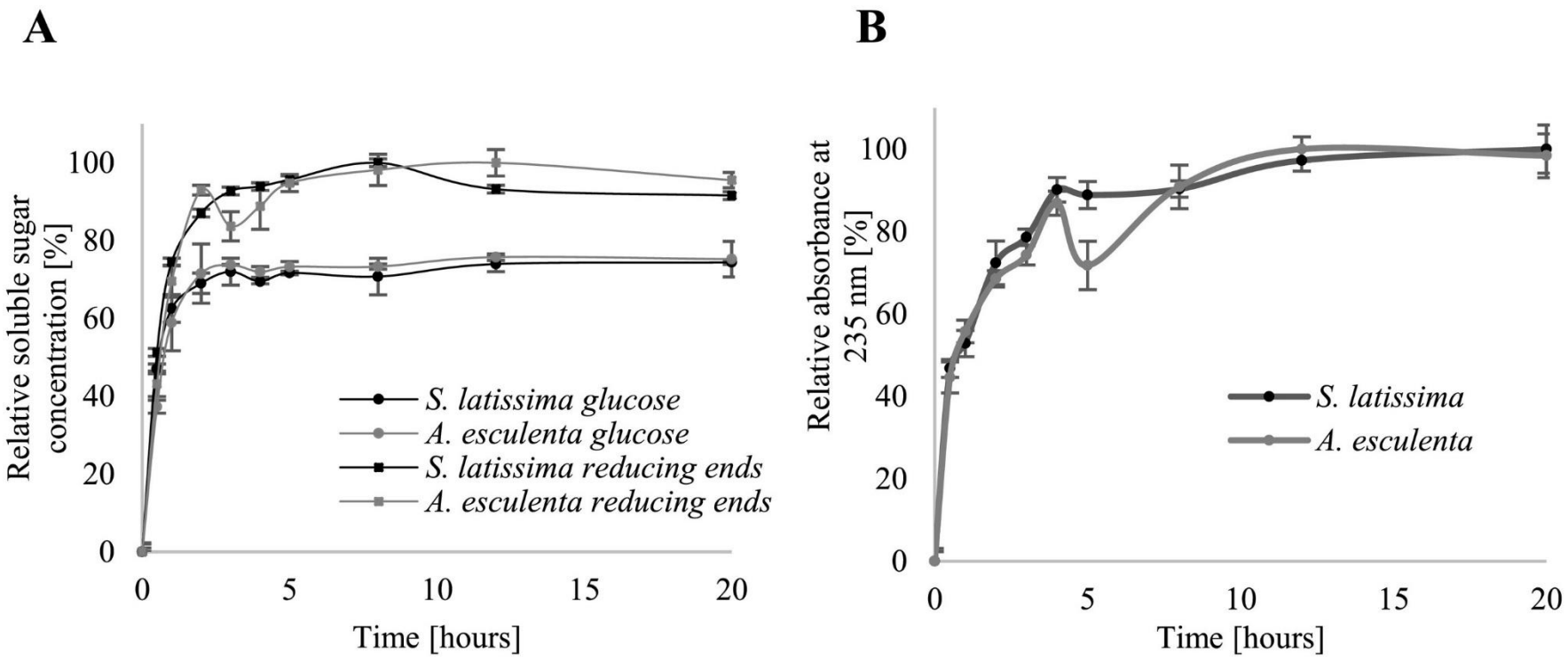


Fig. 8. Curso de tempo da extração enzimática de fucoidano usando uma proporção PL7/PL17 de 30/70 junto com Cellic® CTec2 onde A) mostra a liberação de glicose medida por HPLC e a liberação de extremidades redutoras medidas por DNS e B) mostra o produto relativo formação medida em Abs235 nm para S. latissima (preto) e A. esculenta (cinza).

- Introduction
- Objective
- Methodology
- Results and discussion
- **Conclusion**

Conclusion

- O maior rendimento de extração de fucoidan foi alcançado ao usar celulases junto com ambas as alginato liases endo- (PL7) e exo-atuantes (PL17) em uma proporção de **30/70** para *S. latissima* e **20/80** para *A. esculenta*;

- Os fucoidans extraídos enzimaticamente continham altas quantidades de fucose e sulfato, os principais componentes dos fucoidans, e teores muito baixos de celulose, laminarina e alginato. A maior pureza de fucoidan, com o maior teor de fucose, sulfato e galactose e o menor teor de alginato e glicose, foi alcançada usando uma proporção PL7/PL17 de **30/70** para ambas as amostras de algas marinhas;

- A extração enzimática de fucoidan demonstrou melhorar tanto o rendimento da extração de fucose quanto a pureza de fucoidan, quando comparada à extração química. Além disso, os fucoidans extraídos enzimaticamente tinham pesos moleculares maiores do que os fucoidans extraídos quimicamente, pois nenhuma degradação do fucoidan foi observada durante a extração;

- Investigações da cinética do processo de extração ideal mostraram que a maioria das impurezas foi removida dentro de 5 h de reação.